

TLR7による気道分泌抑制効果の細胞内メカニズム解析とCOPD病態における関与の検討

著者	蒲生 俊一
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3738号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124140

氏 名	がもう しゅんいち 蒲生 俊一
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	TLR7 による気道分泌抑制効果の細胞内メカニズム解析と COPD 病態における関与の検討
論 文 審 査 委 員	主査 教授 一ノ瀬 正和 教授 三浦 昌人 教授 富田 博秋

論 文 内 容 要 旨

背景：慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) の中でも、慢性気管支炎型など慢性的に喀痰の多い症例は増悪を来しやすく予後不良である事が知られている。また近年、COPD や気管支喘息などの慢性気道炎症病態において、自然免疫の関与が注目されてきている。特に Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 7 については、気管支喘息のモデルマウス実験において、そのアゴニストが治療効果を示すとの報告がいくつかなされているが、COPD に対しては検討が進んでいない。

目的：① 生理的な気道分泌に対する TLR7 シグナル活性化の影響を確認し、その細胞内メカニズムを明らかにする。② COPD 気道における TLR7 発現量の変化を正常気道との比較で明らかにする。

方法：市内の屠殺工場より入手した新鮮ブタ気管と、当院で肺癌に対する切除術を受けた患者にインフォームドコンセントを得た上で入手したヒト肺手術検体とを対象として実験を行った。ブタ・ヒト気管を対象とした免疫組織学的検討のほか、新鮮ブタ気道については粘膜下腺細胞を単離・分散し、パッチクランプ法、および細胞内カルシウム (Ca^{2+}) アッセイを施行した。

結果：ブタ気道粘膜下腺細胞に対するパッチクランプ法を用いた検討で、低濃度アセチルコリン (ACh) 刺激による生理的水分・電解質分泌を反映するクロライド (Cl^-)・カリウム (K^+) イオン電流に対し、TLR7 リガンドは抑制効果を示した。細胞内 Ca^{2+} アッセイによる検討から、この TLR7 リガンドによるイオン電流抑制効果は、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の減少によるものである事が示された。更に、protein kinase A (PKA) 阻害薬、cyclic guanosine monophosphate dependent protein kinase (cGK) 阻害薬を用いた細胞内 Ca^{2+} アッセイにより、細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体からの Ca^{2+} 放出系に対する TLR7 シグナルの影響が認められなかった事から、細胞質内から小胞体への細胞内 Ca^{2+} 再取込系に着目し、これを担うイオンポンプである sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase2 (SERCA2) のアンタゴニスト (thapsigargin) を用いた電気生理学的検討および薬理学的検討を行った。その結果、TLR7 リガンドが SERCA2 に作用し活性化させる事で、低濃度 ACh 投与による生理的な細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇から定常状態への回復を促進させる事が示された。また免疫組織化学染色、および免疫蛍光染色を用いた検討では、気道粘膜下腺細胞において TLR7 と SERCA2 が近傍に発現しており、かつヒト肺癌手術検体の気道粘膜下腺細胞および気道上皮細胞において、COPD 気道では非

COPD 気道に対し TLR7 の発現が低下していた。

結論：① TLR7 シグナルが SERCA2 依存性 Ca^{2+} クリアランスを活性化させる事で、生理的な迷走神経刺激により惹起される漿液性分泌を抑制する事が明らかとなった。② 免疫組織化学染色による検討により、COPD 気道において、非 COPD 気道に比較して TLR7 の発現が低下している事が明らかとなった。COPD 増悪はウィルス感染を主な契機とし、気道過分泌がリスク要因として強く関与する事が知られている。正常気道では rhinovirus、influenza virus、parainfluenza virus や respiratory syncytial (RS) virus などを認識する TLR7 が気道分泌を抑制し得るものの、COPD 気道ではその発現低下から TLR7 機能不全を生じ増悪に至る可能性が示唆された。TLR7 シグナルの賦活化はウィルス感染後の気道過分泌を抑制する事で、COPD に対する新規治療ターゲットとなり得る事が推察された。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 TLR7による気道分泌抑制効果の細胞内メカニズム解析とCOPD病態における関与の検討

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 呼吸器内科学分野

学籍番号 B4MD5044 氏名 蒲生 俊一

背景：慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease: COPD）の中でも、慢性的気管支炎タイプや慢性的に喀痰の多いタイプは増悪を来しやすく予後不良である事が知られている。COPDや気管支喘息などの慢性気道炎症病態において、自然免疫の関与が近年注目されてきている。特にToll様受容体（Toll-like receptor: TLR）7については、気管支喘息のモデルマウス実験において、そのアゴニストが治療効果を示すとの報告がいくつかなされているが、COPDに対しては見当が進んでいない。

目的：① 生理的な気道分泌に対するTLR7シグナル活性化の影響を確認し、その細胞内メカニズムを明らかにする。② COPD気道におけるTLR7発現量の変化を正常気道との比較で明らかにする。

方法：市内の屠殺工場より入手した新鮮ブタ気管と、当院で肺癌に対する切除術を受けた患者にインフォームドコンセントを得た上で入手したヒト肺手術検体とを対象として実験を行った。ブタ・ヒト気管を対象とした免疫組織学的検討のほか、新鮮ブタ気道については粘膜下腺を単離・分散し、パッチクランプ法、および細胞内カルシウム（Ca²⁺）アッセイを施行した。

結果：ブタ気道粘膜下腺細胞に対するパッチクランプ法を用いた検討で、低濃度アセチルコリン（ACh）刺激による生理的水分・電解質分泌を反映するクロライド（Cl⁻⁺）イオン電流に対し、TLR7リガンドは抑制効果を示した。細胞内Ca²⁺アッセイおよびsarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2（SERCA2）のアンタゴニストを用いた薬理学的検討で、TLR7リガンドがSERCA2に直接作用し活性化させる事で、低濃度ACh投与による生理的な細胞内Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_i）上昇からの定常状態への回復を促進させた。また免疫組織化学染色、および免疫蛍光染色を用いた検討では、気道粘膜下腺細胞においてTLR7とSERCA2が近傍に発現しており、かつヒト手術検体の気道粘膜下腺細胞および気道上皮細胞において、正常気道に比較しCOPD気道ではそれぞれTLR7の発現が低下していた。

結論：これら結果より、TLR7シグナルはSERCA2を活性化させる事で気道の漿液性分泌を抑制する事が明らかとなった。COPD増悪はウィルス感染を契機とし、気道過分泌を伴う事が強く関与する事が知られている。正常気道ではRhinovirus、influenza virus、parainfluenza virusやrespiratory syncytial (RS) virusなどを認識するTLR7が気道分泌を抑制し得るものの、COPD気道ではその発現低下からTLR7機能不全を生じ増悪に至る可能性が示唆された。TLR7シグナルの賦活化はウィルス感染後の気道過分泌を抑制する事で、COPDに対する新規治療ターゲットとなり得る事が推察された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。